

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

A02

(11)Publication number : 05-038284
(43)Date of publication of application : 19.02.1993

(51)Int.Cl. C12N 5/06
A01N 1/02
A61K 31/70
// C07H 3/06

(21)Application number : 03-173920 (71)Applicant : HOKUREN FEDERATION OF AGRICULT COOP:THE

(22)Date of filing : 15.07.1991 (72)Inventor : TAKAMA KOZO
SUZUKI SATOSHI
IWANO SHINYA
TSUKADA MASAYUKI
TAKEDA HIROYUKI
KOGA YUTAKA

(54) LIVE CELL PRESERVATIVE

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain an inexpensive live cell preservative, containing kestose as an active ingredient, having excellent preserving effects and exhibiting effects on not only freezing preservation but also preservation at a low temperature so as not to freeze the live cells.
CONSTITUTION: A live cell preservative containing 1-kestose as an active ingredient, preferably at 0.1–20% (wt./vol.) concentration. The 1-kestose is obtained by reacting a fructosyltransferase produced by *Scopulariopsis.brevicaulis* with, e.g. sucrose.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 26.05.1993

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 2093078

[Date of registration] 18.09.1996

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-38284

(43)公開日 平成5年(1993)2月19日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 12 N 5/06				
A 01 N 1/02		6742-4H		
A 61 K 31/70		8314-4C		
// C 07 H 3/06		7822-4C		
		7236-4B	C 12 N 5/ 00	E
			審査請求 未請求	請求項の数3(全5頁)

(21)出願番号 特願平3-173920

(22)出願日 平成3年(1991)7月15日

(71)出願人 390022954
ホクレン農業協同組合連合会
北海道札幌市中央区北4条西1丁目3番地
(72)発明者 高間 浩蔵
北海道函館市東山2丁目47番3号
(72)発明者 鈴木 晴
北海道函館市広野町6番407-13
(72)発明者 岩野 信也
北海道帯広市西11条南26丁目58番地
(72)発明者 ▲塚▼田 正幸
北海道札幌市中央区北4条西1丁目3番地
ホクレン農業協同組合連合会内
(74)代理人 弁理士 光来出 良彦 (外3名)
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 生細胞保存剤

(57)【要約】

【目的】 ラフィノースは生細胞保存剤の成分として知られているが、天然物質から抽出して得られるため、生産量も限られており、価格も高かった。微生物工業で大量生産できる1-ケストースを使用して生細胞保存剤を提供することを目的とする。

【構成】 1-ケストースを濃度0.1~20% (W/V) に調整して生細胞保存剤とする。この保存剤は、哺乳動物の精子、魚類の精子、又は動物培養細胞に対して、凍結保存時又は低温保存時に添加して使用すると長期保存効果がある。また、1-ケストース単独でも、他の生細胞保存剤と併用しても長期保存効果がある。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 1-ケストースを有効成分として含有することを特徴とする生細胞保存剤。

【請求項2】 1-ケストース濃度が0.1~20% (W/V) に調整されたことを特徴とする請求項1記載の生細胞保存剤。

【請求項3】 哺乳動物の精子、魚類の精子または動物培養細胞から選ばれた生細胞の保存に用いることを特徴とする請求項1または2記載の生細胞保存剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、生細胞を凍結状態または低温で長期間保存する際に必要な生細胞保存剤、特に哺乳類、魚類の精子及び動物培養細胞の生細胞保存剤に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 生細胞は、生活機能や生物学的活性を有しており多方面で利用価値があるが、温度の高い条件下では代謝あるいは変性のために経時に変化、生活機能や生物学的活性が低下ないし消失してしまう。このような生細胞の長期保存には凍結保存が適すると考えられ、例えば細胞内凍害保護物質と細胞外凍害保護物質の共働効果を図った特公昭60-29471号や、凍結保護剤としてメチルセルロースを使用した特開昭63-216476号や、凍結保護剤としてベタインを使用した特開平2-422号等、今まで多くの研究が行われている。

【0003】 一般に、生細胞に対する凍害防止効果を示す物質の条件として次の項目が挙げられる。

①中性物質 (neutral solute) であること。

②低分子物質 (即ち、細胞に対する透過性が高い物質) であること。

③束一性 (colligative property, 即ち、水素結合を作り易く、共晶点が低い性質) を持っていること。

【0004】 ④高濃度でも細胞に対する毒性が低いこと。

現在のところ、これらの条件を満たし広く使用されている物質に、グリセリンやDMSO (dimethylsulfoxide) がある。しかし、グリセリンについては単独で使用することは稀で、動物、例えば牛の精子凍結保存希釈液にグリセリンと糖との混合液が広く用いられている。

【0005】 そのメリットは、室温で一度の希釈が可能であること、グリセリン平衡時間が短縮されること、および広い範囲の凍結速度が適用できる等があげられる。また糖類の凍害防止効果は、5、6炭糖 (Pentose, Hexose) よりも2、3糖類の方が優れていることから、従来は主に3糖類であるラフィノースが用い

られてきた。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】 しかしながら、ラフィノースの化学合成は不可能で、天然に存在する植物例えればピートなどから抽出、精製しなければ入手できない。その供給量は限られているので、高価であった。またDMSOは、有機溶剤であるため水洗い等の操作が必要となることがあり、一般的に取扱が繁雑でこれにかわるもののが強く望まれていた。

10 【0007】 本出願人は、ショ糖を原料として高純度の1-ケストースを安価に製造する方法を既に出願しており(特願平2-224312号)、また、この1-ケストースに生細胞の保存効果があることの知見を得た。そこで本発明は、1-ケストースを用いた生細胞保存剤を提供することを目的とする。

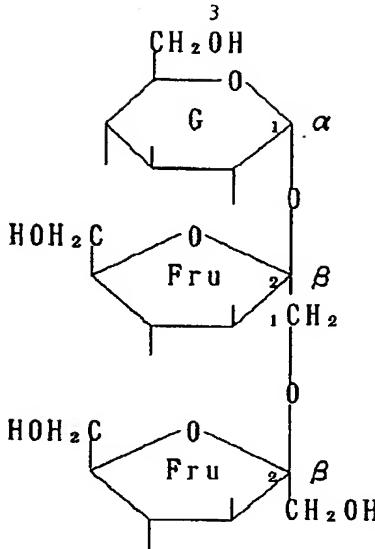
【0008】

【課題を解決するための手段】 前記問題点を解決するために本発明は、1-ケストースを有効成分として含有することを特徴とする生細胞保存剤とするものである。また本発明は、1-ケストース濃度が0.1~20% (W/V) に調整されたことを特徴とする生細胞保存剤とするものである。

20 【0009】 また本発明は、哺乳動物の精子、魚類の精子または動物培養細胞から選ばれた生細胞の保存に1-ケストースを用いることを特徴とする生細胞保存剤とするものである。1-ケストースはいわゆるフラクトオリゴ糖の一種であり、その構造はグルコース (G) とフラクトース (F) が結合したシュークロース (GF) のフラクトース部分に、 β -2, 1結合によりフラクトースが1分子結合したものであって、O- α -D-グルコビラノシル-(1→2)-O- β -D-フラクトフラノシル-(1→2)-O- β -D-フラクトフラノシドである。その分子式は、C₁₈H₃₂O₁₆であり、その分子量は504である。次に1-ケストースの構造式を示す。

【0010】

【化1】



【0011】従来のフラクトオリゴ糖の用途は特公昭59-53834号に開示されているビフィズス活性や特開昭59-110621号に開示されている利尿剤等があるがいずれもフラクトオリゴ糖の混合物、即ち1ケストース(GF₂)、ニストース(GF₃)、フラクトフラノシルニストース(GF₄)の混合物であった。1-ケストースの製造法は特開平2-163093号や特開平2-249493号に開示されており、ショ糖にスコプラリオプシス・ブレビカウリス(*Scopulariopsis brevicaulis*)の生産するフラクトシルトランスクエラーゼを作用させることによって得ることができる。また、ショ糖を原料として高純度の1-ケストースを安価に製造する方法は、本出願人が特願平2-224312号として既に出願している。

【0012】この生産法によると工業的に1-ケストー*

*スが単品でしかも高純度(99.9%)で大量に得られる。この高純度1-ケストースが生細胞保存剤として優れた効果を有していることの知見を得、本発明を完成するに至った。本発明において使用する1-ケストースは、凍結する生細胞に適した濃度で使用し、その濃度は0.1~20%(W/V)の範囲内である。また本発明の1-ケストースは、生細胞保存剤の組成の一部または全部として使用することができる。例えば、哺乳動物の精子の凍結保存においては、既存の生細胞保存剤(糖含有グリセリン・卵白懸濁液)中の1組成物であるラフィノースの代替として0.1~0.5%(W/V)使用することができる。

【0013】また、魚類の精子や動物培養細胞においては1-ケストースを3~20%(W/V)に調整し、そのまま単独で凍結保存剤として使用することができる。以下に、実施例をもって本発明を説明するが、これはあくまでも例示であって、本発明はこれに限定されるものではない。

【0014】20 【実施例1】牛の精子の凍結保存について、本発明の1-ケストースを含む生細胞保存剤を使用し、その保存効果の実験を行なった。対照として、従来から使用されている生細胞保存剤であるラフィノースを含む組成物からなる生細胞保存剤を使用した。生細胞保存剤に関しては、対照と本発明のものは1-ケストースとラフィノースが代わっただけであり、その他の成分は全て同じである。

【0015】実験に使用した凍結保存液の組成を次の表1に示す。

30 【0016】
【表1】

牛精子凍結保存液組成

実施例1	対照	
2.7%クエン酸ナトリウム	同左	76.5 ml
卵白	同左	10.0 ml
デトロース	同左	2 g
フラクトース	同左	1 g
1-ケストース	ラフィノース	0.5 g
グリセリン	同左	10.0 ml

【0017】牛の精子の凍結保存の実験条件は、凍結温度を-196°Cで、6か月間保存した後、解凍して精子

活力を調べた。精子の活力の判定は、顕微鏡にて精子を50 観察し、勢い良く前進するもの(++)、前進するも

5

の(++)、頭を動かすもの(+)とし、(++)を精子活力の数字(%)とした。その結果を次の表2に示す。

*【0018】
【表2】

*

牛精子凍結保存結果

種牛番号	精液量 ml	精子数 $10^8/ml$	採集直後の 精子活力	凍結(6ヶ月)融解後の精子活力	
				1-ケストース	ラフィノース
H-3026	3.2	9.9	60	30	30
H-3027	3.0	14.1	65	45	45
H-314	7.2	11.0	60	45	50

【0019】表2によれば、本発明の1-ケストースを含む生細胞保存剤は、従来のラフィノースを含む生細胞保存剤と同等の効果を示すことがわかる。

【0020】

【実施例2】サクラマス(*Oncorhynchus masou*)の精子 $20\mu l$ に1-ケストースまたはラフィノースの水溶液、或いは、DMSO溶液(25 mM Tris-HCl、pH 7.5に溶解したもの)を $80\mu l$ 加え、最終濃度を1-ケストース、ラフィノースは $60\mu M$ 、DMSO溶液は2%となるようにして各保存溶液を調製した。なお、1-ケストースは純度99.9%。

※9%のものを用いた。このように調製した各保存溶液 $50\mu l$ を、ドライアイス上にドリルで作った直径5mmの窓みに乗せて急速凍結して、凍結した精子ペレットを作成した。

【0021】この精子ペレットを $-70^{\circ}C$ で保存し、20日後と51日後に $4^{\circ}C$ で解凍し、顕微鏡下で運動性を調べた。採精直後の運動性(運動開始から停止までの時間)を100とした。その結果を次の表3に示す。

【0022】

【表3】

サクラマス精子の保存性に及ぼす各種溶液の効果

溶液名	0日目	2日目	51日目
	精子の運動性	精子の運動性	精子の運動性
プランク	100	50	40
DMSO	100	80	90
ラフィノース	100	0	0
1-ケストース	100	95	90

【0023】表3からは、本発明の1-ケストースを単独使用した生細胞保存剤が優れた保存効果を有することがわかる。

【0024】

【実施例3】培養細胞としてガン細胞由来のHeLa細胞を用い、5%牛胎児血清を添加したL-15培地にて $37^{\circ}C$ で単層を形成するまで培養した後、単層を形成したHeLa細胞をトリプシンで消化することによりフラスコの底に付いたHeLa細胞を剥がす。これを滅菌したビベットで分取し、 $3 \times 10^5 / ml$ になるように動物細胞培養用の一般的培地であるL-15培地に懸濁し

た。これに1/5量の1-ケストース、グルコース、シユーカロース、DMSOを最終濃度が10%になるように加えた。なお、1-ケストースは純度99.9%のものを用いた。これを $4^{\circ}C$ 、 $-20^{\circ}C$ 、 $-80^{\circ}C$ で16日間保存後、室温解凍し生細胞数をトリバンブルー染色したのち血球計算板で生細胞の数を測定した。なお、該染色法を使用すると生細胞の核を染めるが、死細胞の核は染めないので、凍結保存後の生存率がわかる。その結果を次の表4に示す。

【0025】

【表4】

HeLa細胞の保存性に及ぼす各種溶液の効果

	4°C	-20°C	-80°C
1-ケストース	98	78	92
DMSO	81	93	95
グルコース	96	60	89
シュークロース	95	58	90

【0026】表4からは、本発明の1-ケストースを単独使用した生細胞保存剤は4°C、-20°C、-80°Cの何れにおいても優れた保存効果を示すことがわかる。

【0027】

【実施例4】培養細胞としてアフリカミドリザルの腎細胞のVero細胞を用い、5%牛胎児血清を添加したL-15培地にて37°Cで培養後、単層を形成したVero細胞をトリプシンで消化し、 $1.5 \times 10^5 / ml$ になるようにL-15培地に懸濁した。これに1/5量の*20

*1-ケストース、グルコース、シュークロース、DMSOを最終濃度が10%になるように加えた。なお、1-ケストースは純度99.9%のものを用いた。これを4°C、-20°C、-80°Cで16日間保存後、室温解凍し生細胞数をトリパンブルー染色したのち血球計算板で測定した。その結果を次の表5に示す。

【0028】

【表5】

Vero細胞の保存性に及ぼす各種溶液の効果

	4°C	-20°C	-80°C
1-ケストース	78	53	85
DMSO	76	83	92
グルコース	61	72	53
シューカロース	55	58	78

【0029】表5からは、本発明の1-ケストースを単独使用した生細胞保存剤は4°C、-80°Cで優れた保存効果を示すことがわかる。以上、本実施例を実験データに基づいて説明したが、本発明は上記実施例に限定されず、本発明の趣旨に基づき、種々の変形が可能である。例えば、1-ケストースの純度を99.9%のものについて実験したが、もっと低純度のものでも使用可能であることは言うまでもない。

【0030】

※40

※【発明の効果】本発明の生細胞保存剤は、1-ケストースを単独で使用しても、または他の生細胞保存剤と併用しても、何れもの場合でも優れた保存効果を有する。本発明の生細胞保存剤は、凍結保存だけではなく、凍結しない程度の低温での保存にも効果を有する。

【0031】1-ケストースは微生物工業により大量生産ができるので、安価に生細胞保存剤を提供することができる。

フロントページの続き

(72)発明者 竹田 博幸

北海道札幌市中央区北4条西1丁目3番地
ホクレン農業協同組合連合会内

(72)発明者 古賀 裕

北海道札幌市中央区北4条西1丁目3番地
ホクレン農業協同組合連合会内